

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 juillet 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/055173 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 1/20,
15/74, C12P 7/56

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet AR-
MENGAUD AINE, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 PARIS
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003665

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
10 décembre 2003 (10.12.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02 15 865 13 décembre 2002 (13.12.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVEL-
OPPEMENT (IRD) [FR/FR]; 213, Rue La Fayette,
F-75480 PARIS CEDEX 10 (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : FARDEAU,
Marie-Laure [FR/FR]; Chemin de Bellepeire, F-13170
LES PENNES-MIRABEAU (FR). COMBET-BLANC,
Yannick [FR/FR]; 21 Rue Dragon, F-13006 MARSEILLE
(FR). OLLIVIER, Bernard [FR/FR]; Quartier Valcros,
F-13360 ROQUEVAIRE (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: BACTERIAL STRAINS OF GENUS *EXIGUOBACTERIUM*, CULTURE METHOD AND USES

(54) Titre : SOUCHES BACTERIENNES DU GENRE *EXIGUOBACTERIUM*, PROCEDE DE CULTURE ET APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns bacterial strains of genus *Exiguobacterium*. Said strains are thermoresistant, capable of growing on sugar and starch substrates and/or capable of producing metabolites such as L(+) lactate. The invention is useful for producing metabolites such as L(+) lactate.

(57) Abrégé : L'invention se rapporte à des souches bactériennes du genre *Exiguobacterium*. Ces souches sont thermotolérantes, sont capables de croître sur des substrats de sucres et d'amidon et/ou sont capables de produire d L(+) lactate. Application à la production de métabolites tels que le L(+) lactate.



WO 2004/055173 A1

JC17 Rec'd PCT/PTO 10 JUN 2005

SOUCHES BACTERIENNES DU GENRE *EXIGUOBACTERIUM*

PROCEDE DE CULTURE ET APPLICATIONS

L'invention a pour objet de nouvelles souches du
5 genre *Exiguobacterium*.

Elle vise également un procédé de culture de ces
souches, ainsi que leurs applications industrielles.

10 L'invention se rapporte plus particulièrement à des
souches bactériennes telles qu'isolées d'échantillons
provenant de systèmes hydrothermaux marins profonds.

L'étude par les inventeurs des échantillons prélevés
les a conduit à isoler une nouvelle espèce
15 d'*Exiguobacterium* présentant des propriétés de grand
intérêt dans divers domaines de l'industrie.

L'invention a donc pour but de fournir des souches de
cette nouvelle espèce.

Elle vise également à fournir des protocoles de
20 culture de ces souches précisant les conditions physico-
chimiques et la composition du milieu de culture qui
permettent de produire favorablement des cellules et/ou
certains métabolites, plus particulièrement du L(+) lactate.

25 Selon un autre aspect, l'invention vise l'utilisation
directe de ces souches ou celle de leurs métabolites dans
divers domaines de l'industrie.

Les souches bactériennes de l'invention sont
caractérisées en ce qu'elles possèdent une séquence d'ADN
30 dont au moins une partie est capable de s'hybrider avec de
l'ADN génomique ou plasmidique de la souche déposée le 5
décembre 2002, sous le n° I-2962, à la Collection Nationale
de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 25 rue du
Docteur Roux, 75015 PARIS.

JC17 Rec'd PCT/PTO 10 JUN 2005

De manière avantageuse, au moins 70 % du génome des souches de l'invention est capable de s'hybrider avec l'ADN de la souche déposée.

L'invention vise en particulier les souches
5 bactériennes définies ci-dessus, caractérisées par la séquence SEQ ID N°1 de l'ARNr 16S :

```
CGGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCCGTCTGAACCCTTCGGGGGACGACGGTGAATGA
GCGGCGGACG
10 GGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGAT
GTGTCATCGG
ACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAA
CGGCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
15 CCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGCTTTTCG
GGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGC
GAGAAAGCCA
20 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCA
GGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTT
GAGTATAGGA
GAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
25 ACTCTTTGGC
CTATAACTGACGCTGAGGCTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGA
GTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAA
30 GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACG
CGAAGAACCT
TACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGT
GGTGCATGGT
TGTCGTACAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCC
35 AGCATTnAGT
TGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGAGTTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAG
CCGTTCTCAG
40 TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCG
GTGAATACGT
TCCCGGGTCTTGATACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCG
TAAGGAGCCA
GCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGA
45
```

ou une séquence ayant une similitude avec SEQ ID N°1 supérieure à 97%.

Selon un autre aspect, ces souches sont caractérisées
50 en ce qu'elles sont thermotolérantes, saccharolytiques et
amylolytiques et/ou qu'elles sont capables de produire du
lactate.

On notera que, de manière avantageuse, le lactate produit est à plus de 95 % du L(+) lactate.

Par l'expression "thermotolérante", on entend des souches bactériennes capables de croître à des températures de l'ordre de 40 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,15, avec un optimum pour la croissance à 45°C, à un pH de 7 environ.

L'invention vise plus particulièrement des souches du genre Exiguobacterium tel que montré par comparaison des séquences de l'ARN de la fraction 16 S des ribosomes.

Ces souches sont encore caractérisées par le fait qu'elles ne réduisent pas le sulfate, le thiosulfate, le soufre, le sulfite.

Les souches bactériennes de l'invention sont encore caractérisées en ce qu'elles sont Gram positif.

Selon encore une autre disposition, la teneur de l'ADN des souches bactériennes de l'invention en guanine plus cytosine est de l'ordre de 50 mole %.

L'invention vise en particulier la souche bactérienne déposée à la C.N.C.M. le 05 décembre 2002 sous le n° I-2962.

La référence d'identification de cette souche est 10C. Comme nom de désignation taxonomique, on utilisera Exiguobacterium lactigenes sp. nov.

Les mutants des souches répondant aux définitions qui précèdent entrent également dans le cadre de l'invention dès lors qu'ils conservent au moins 70 % de capacité d'hybridation avec l'ADN génomique de la souche déposée.

Conformément à l'invention, les souches bactériennes définies ci-dessus sont obtenues par culture dans des conditions anaérobies facultatives, à un pH de 5,4 à 9,15, à 37°C, dans un milieu de base comme défini ci-après, contenant un sucre utilisable par ces souches comme source d'énergie.

Les souches bactériennes de l'invention sont avantageusement utilisées dans des procédés de fermentation alimentaire. Leurs propriétés fermentaires et enzymatiques permettent d'y remplacer avantageusement et/ou de compléter
5 celles attribuées aux bactéries lactiques utilisées habituellement.

La capacité des souches de l'invention à fermenter une grande variété de sucres, notamment le D-glucose, le D-fructose, le D-galactose, le D-mannose, le mannitol, le D-
10 ribose, le D-saccharose et le DL-maltose et l'amidon constitue un atout important. Certains de ces sucres (glucose, fructose, saccharose) potentiellement utilisables comme substrats énergétiques sont, en effet, disponibles en grande quantité, notamment dans les jus fermentaires
15 sucriers.

La possibilité d'agir sur le métabolisme de ces souches en contrôlant les paramètres physico-chimiques du milieu de culture (pH, rapport sucres/peptides) élargit leur domaine d'application. Ainsi, il est possible par
20 exemple d'orienter la fermentation vers la production de cellules et de métabolites cellulaires tels que des enzymes.

L'invention vise donc également un procédé de production de métabolites, en particulier de L(+) lactate,
25 caractérisé en ce qu'il comprend

- la culture d'une souche bactérienne telle que définie ci-dessus, dans des conditions appropriées pour son développement et pour la production du métabolite recherché,
- 30 - la récupération des métabolites produits, suivi de l'isolement du métabolite désiré et sa purification.

L'acide lactique produit par les souches de l'invention est d'un grand intérêt car il est constitué à plus de 95 % par du L(+) lactate qui est assimilable par

les organismes supérieurs alors que le D(-) lactate présente un caractère de toxicité.

On le sépare de la culture, et on le concentre par exemple par évaporation, le cas échéant jusqu'à siccité.

5 Les concentrés ou produits secs sont utilisés tels quels ou traités pour former des dérivés souhaités de l'acide lactique.

Les applications de l'acide lactique ou de ses esters et autres dérivés concernent de nombreux domaines.

10 L'acide lactique est ainsi utilisé dans l'industrie agro-alimentaire en l'incorporant dans des boissons, des bières, des produits laitiers tels que crème, fromage, beurre, des glaces ou encore des confitures.

Comme tensio-actif, on l'utilisera avec avantage en 15 panification et viennoiserie sous forme par exemple de lactyl mono- et diglycérides et de sodium stéaryl lactylate.

Dans l'industrie pharmaceutique, le lactate de 20 potassium peut constituer un substitut du chlorure de sodium particulièrement précieux dans les cas d'hypertension.

Il est aussi utilisé pour ses propriétés de complexant, notamment avec le fer et le calcium pour traiter les carences.

25 Enfin parmi les applications de l'acide lactique, de ses sels et dérivés dans l'industrie chimique, on citera son utilisation dans l'élaboration de résines plastiques, d'adhésifs, de pesticides, de textiles, ou encore dans des peintures, des diluants et des solvants, ou pour le 30 traitement de surface de métaux.

On soulignera son grand intérêt dans la chimie des polymères où il sert à fabriquer des polylactides et/ou des copolymères avec par exemple des oxydes de polyalkylène, des alcools polyvalents, de l'acide glycolique, des acides

hydroxycarboxyliques, des copolymères d'éthylène et de propylène, des caoutchoucs butyliques ou des élastomères de polyuréthane thermoplastiques. A partir de ces polymères et/ou copolymères, divers articles peuvent être fabriqués
5 en particulier pour l'emballage, des films à usages médicaux pour réaliser des pansements ou encore des matières d'enrobage pour sutures chirurgicales.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont rapportés dans la description qui suit, donnée à titre
10 d'exemple, qui concerne la souche 10C mentionnée plus haut, déposée à la C.N.C.M. sous le n°I-2962.

a. Protocole d'isolement de la souche 10C

L'isolement a été effectué à partir d'échantillons de
15 systèmes hydrothermaux profonds marins.

. Milieux et méthodes de culture

On utilise un milieu de base contenant (pour 1 litre
20 d'eau distillée) : 1g de NH_4Cl , 0,3g de KH_2PO_4 , 0,3g de K_2HPO_4 , 25g de NaCl , 0,2g de CaCl_2 , 0,1g de KCl , 3g de MgCl_2 , 0,5g de CH_3COONa , 0,5g de cystéine-HCl, 0,1g d'extrait de levure (Difco Laboratories), 10ml d'une solution minérale de Balch (1), 1mg de résazurine. Le pH
25 est ajusté à 7,3 avec KOH 10M et le milieu est porté à ébullition sous un courant d'azote et refroidi jusqu'à la température ambiante.

Les compositions de la solution minérale de Balch et de la solution d'oligoéléments de Balch sont les suivantes
30 :

Solution minérale de Balch.

KH_2PO_4	6	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6	g
NaCl	12	g

MgSO ₄ ,7H ₂ O	2,6	g
CaCl ₂ ,2H ₂ O	0,16	g
H ₂ O distillée q.s.p.	1000	ml

5 Solution d'oligo-éléments de Balch

Acide nitriloacétique	1,5	g
MnSO ₄ ,2H ₂ O	0,5	g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	3	g
NaCl	1	g
10 FeSO ₄ ,7H ₂ O	0,1	g
CoCl ₂ ,6H ₂ O	0,1	g
CaCl ₂ ,2H ₂ O	0,1	g
ZnCl ₂	0,1	g
CuSO ₄ ,5H ₂ O	0,01	g
15 AlK(SO ₄) ₂	0,01	g
H ₃ BO ₃	0,01	g
Na ₂ MoO ₄	0,01	g
H ₂ O distillée q.s.p.	1000	ml

20 Le pH du milieu de culture est ajusté à pH 7,3 avec KOH 10 M.

Le milieu est ensuite porté à ébullition, puis refroidi jusqu'à la température ambiante et réparti sous un courant d'azote dans des tubes de Hungate, à raison de 5 ml
25 par tube, et dans des flacons de sérum, à raison de 20ml sous courant d'azote et de gaz carbonique (80 :20 ;v/v).

Après traitement à l'autoclave des récipients scellés à 110°C pendant 45 min, on ajoute Na₂S, 9H₂O, Na₂CO₃ et du glucose, à partir de solutions stériles, ce qui conduit,
30 respectivement à des concentrations de 0,04%, 0,2% et 20mM.

Pour initier l'enrichissement de la culture, on inocule un échantillon de 20ml de milieu, et on incube à 37°C. La culture est purifiée en utilisant la méthode des

rolls tubes de Hungate avec un milieu solidifié avec 15g/l d'agar.

b. Description de la souche

5 La souche 10C est une bactérie à Gram positif, non sporulante, anaérobie facultative, se présentant sous forme de bâtonnets, avec une croissance optimale à 45°C, à pH 7 et 0-2% de NaCl.

Il s'agit d'une souche hétérotrophe qui requiert de
10 l'extrait de levure pour fermenter les sucres.

La température de croissance de la souche est de 12 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,1, et une concentration en NaCl entre 0 et 12%.

On observe une croissance optimale à 45°C, à pH 7 et
15 0-2% de NaCl.

Dans un milieu contenant des hydrates de carbone, notamment du glucose comme source d'énergie, on ajoutera avec avantage des peptides, par exemple des extraits de levure, pour favoriser la croissance.

20

- propriétés métaboliques

La fermentation de sucres conduit essentiellement à du (L+)lactate (environ 2 moles de lactate/mole de glucose fermenté). Dans des conditions de croissance adaptées, on
25 observe la production de formate, acétate et éthanol.

Caractères génétiques :

La souche 10C est caractérisée par une teneur de l'ADN en guanine + cytosine de 50,4 mole%.

La purification et l'extraction de l'ADN,
30 l'amplification et le séquençage de l'ARNr 16S sont réalisés selon (2), (3) et (4). L'ADN a été isolé par chromatographie sur hydroxyapatite selon le procédé de Cashion et al (5). L'hybridation ADN-ADN a été effectuée comme décrit par De Ley et al (6), avec la modification

décrite par Huss et al (7) et Escara et Hutton (8) en utilisant un spectrophotomètre modèle 2600 équipé d'un thermoprogramme 2527-R (Gilford Instrument Laboratories Inc., Oberlin, Ohio, EUA).

5 La séquence de l'ARNr 16S correspond à SEQ ID N° 1 donnée ci-dessus.

c. Tableau de différences des substrats entre la souche 10C et *E.aurantiacum*

Substrats	10 C	<i>Exig aurantiacum</i>
Lactate	-	-
Benzoate	-	-
Glucose	+	+
Fructose	+	-
Galactose	+	+
Dx-ylose	-	-
Mannose	+	-
Mannitol	+	+
Gycérol	-	+
Fumarate	-	+
Pyruvate	-	-
Arabinose	-	-
Ribose	+	+
Sorbose	-	-
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Acétate	-	-
Butyrate	-	-
Propionate	-	-
Casaminoacides	-	-
Dulcitol	-	-
Lactose	-	-
Rhamnose	-	-
Melizitose	-	-

d. Procédés de culture et applications

5 I- PRODUCTION DE BIOMASSE PAR FERMENTATION DE SUCRE

On opère en milieu non renouvelé.

La fermentation est régulée à un pH de 7 à l'aide d'une solution alcaline (soude par exemple) et à une température de 45°C. On utilise un milieu de culture
10 répondant à la composition suivante :

- Glucose	à calculer
- Extrait de levure/hydrolysat de protéines	à calculer
- NH_4Cl	1 g/l
- NaCl	0,5 g/l
15 - KH_2PO_4	0,3 g/l
- K_2HPO_4	0,3 g/l
- $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
- KCl	0,1 g/l
- $\text{CaCl}_2 2\text{H}_2\text{O}$	0,1g/l

20 Les concentrations en sucre et en extraits de levure sont fonction de la concentration en cellules que l'on souhaite obtenir.

Le sucre est autoclavé séparément du reste du milieu de culture, ainsi que certains sels minéraux qui forment un
25 précipité lors de l'autoclavage. Ils sont ensuite ajoutés stérilement à l'autre partie du milieu de culture (extrait de levure + minéraux, autoclavés ensemble), puis le volume final est ajusté avec de l'eau distillée stérile. L'exemple ci-dessous permet de mieux comprendre le protocole de
30 préparation des milieux :

Exemple de préparation de 16 litres d'un milieu à 40 g/l de saccharose et 3 g/l d'extrait de levure :

1°) Pesée et autoclavage

		Concentration	Masse à peser	
5	Saccharose	40 g/l	640 g	Dans env. 500 ml
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2 g/l	3,2 g	d'eau distillée.
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g/l	1,6 g	Autoclavage 110°C, 20 à 30 min.
	Extrait			
10	de levure	3 g/l	48 g	
	NH ₄ Cl	1 g/l	16 g	
	KH ₂ PO ₄	0,3 g/l	4,8 g	Dans env. 15 l d'eau
	K ₂ HPO ₄	0,3 g/l	4,8 g	distillée.
	NaCl	0,5 g/l	8 g	Autoclavage 121°C, 1h30.
15	KCl	0,1 g/l	1,6 g	

NB : le sucre est autoclavé dans un faible volume de liquide et seulement 20 minutes à 110°C pour éviter l'hydrolyse du saccharose. Les sels de magnésium et de calcium sont autoclavés à part des autres sels et de l'extrait de levure afin d'éviter toute précipitation.

2°) Assemblage : la solution à base de sucre est transférée dans les 15 litres de milieu contenant l'extrait de levure, puis de l'eau distillée stérile est ajoutée pour compléter jusqu'à 16 litres. Tous ces transferts se font stérilement, autour de la flamme d'un Bec Bunsen, au moyen d'une surpression d'azote appliquée dans le fût à vider pour pousser le liquide.

30

3°) Homogénéisation : un flux d'azote N₂ est mis à buller dans le milieu ainsi assemblé afin de mélanger tous les éléments et d'assurer l'anaérobiose.

2. Mode de fermentation

Les études ont été réalisées en mode discontinu, ou batch, rendu continu par l'enchaînement des batchs. Il s'agit d'un système de "feed-harvest", ou "batchs répétés", qui se schématise par l'enchaînement séquentiel de trois étapes : remplissage du fermenteur par du milieu neuf, puis culture des bactéries en batch, puis vidange du moût de fermentation en laissant un pied de cuve pour l'inoculation du batch suivant, puis nouveau remplissage, etc.

D'un point de vue pratique, l'avantage de ce système réside dans le fait que les phrases de nettoyage et de stérilisation du fermenteur entre deux batchs sont supprimées, et dans la possibilité d'automatisation du procédé. En effet, il est possible de programmer un automate qui déclenche les opérations de vidange et de remplissage selon la valeur de paramètres acquis en ligne par une unité de régulation.

II. PRODUCTION DE BIOMASSE PAR FERMENTATION D'AMIDON

Dans d'autres expérimentations, en utilisant un substrat d'amidon et le milieu tamponné défini ci-dessus (mais avec 10 g d'amidon par litre), on obtient une transformation de l'amidon donnant plus de 95% de L(+) lactate et des traces de formiate.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Balch W.E. et al, 1979, Microbiol. Rev. 43,260-296,
- 5 (2) Andrews K.T. & Patel B.K.C., 1996, Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 265-269,
- (3) Love C.A. et al, 1993, Syst. Appl. Microbiol. 16, 244-251,
- (4) Redburn A.C. & Patel B.K.C., 1993, FEMS Microbiol. Lett.
- 10 113, 81-86.
- (5) Cashion P., 1977, Anal. Biochem, 81:461-466.
- (6) De Ley J, 1970, Eur. J. Biochem, 12:133-142,
- (7) Huss V.A.R., 1983, J. Syst. Appl. Microbiol, 4: 184-192,
- 15 (8) Escara J.F., 1980, Biopolymers, 19: 1315-1327.

REVENDICATIONS

1/ Souches bactériennes, caractérisées en ce qu'elles possèdent une séquence d'ADN dont au moins une
5 partie est capable de s'hybrider avec de l'ADN génomique ou plasmidique de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le n° I-2962, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.).

10 2/ Souches bactériennes selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'au moins 70 % de leur génome est capable de s'hybrider avec l'ADN de la souche déposée.

15 3/ Souches bactériennes selon la revendication 1 ou 2, caractérisées par la séquence SEQ ID N°1 de l'ARNr 16S :

```

GCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCCGTCTGAACCCCTTCGGGGGGACGACGGTGGAATGA
GCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGGCTAATACCGGAT
20 GTGTCATCGG
ACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAA
CGGCCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCT
25 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGCTTTTCG
GGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGGTACCTTGC
GAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
30 AGCGCGCGCA
GGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTT
GAGTATAGGA
GAGAAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCG
ACTCTTTGGC
35 CTATAACTGACGCTGAGGCTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGA
GTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAA
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
40 CGAAGAACCT
TACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGT
GGTGCATGGT
TGTGCTGAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCC
AGCATTAAGT
45 TGGGCACTCTAGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGAGTTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAG
CCGTTCTCAG
```

TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCG
GTGAATACGT
TCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCG
TAAGGAGCCA
5 GCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGGCTGA

ou une séquence ayant une similitude avec SEQ ID N°1 supérieure à 97%.

10 4/ Souches bactériennes selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce qu'elles sont thermotolérantes, saccharolytiques et amylolytiques et/ou capables de produire du L(+)lactate.

5/ Souches selon l'une quelconque des
15 revendications 1 à 4, caractérisées par des propriétés de croissance à des températures de l'ordre de 40 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,15, avec un optimum pour la croissance à 45°C, à un pH de 7 environ.

6/ Souches bactériennes selon l'une quelconque des
20 revendications 1 à 5, caractérisées par une teneur de leur ADN en guanine et cytosine de 50 mole% environ.

7/ Souche bactérienne déposée à la C.N.C.M. le 5 décembre 2002, sous le numéro I-2962.

8/ Procédé de culture de souches bactériennes selon
25 l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on opère dans des conditions anaérobies facultatives, à un pH de 5,4 à 9,15 environ, à 37°C, en particulier de 6,5 à 7,5, dans un milieu de base contenant un sucre utilisable par ces souches comme source d'énergie.

30 9/ Application des souches bactériennes selon l'une des revendications 1 à 7, dans des procédés de fermentation alimentaire.

10/ Procédé de production de métabolites tels que
le L(+) lactate, caractérisé en ce qu'il comprend

35 - la culture d'une souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 dans des conditions

appropriées pour son développement et pour la production du métabolite recherché,

- la récupération des métabolites produits,
l'isolement du métabolite désiré et sa purification.

JC17 Rec'd PCT/PTO 10 JUN 2005

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.)
 <120> SOUCHES BACTERIENNES DU GENRE EXIGUOBACTERIUM PROCEDE DE CULTURE
 ET APPLICATIONS
 <130> CP/VB 60859
 <140> 0215865
 <141> 2003-12-10
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1510
 <212> DNA
 <213> Exiguobacterium acetylicum
 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1117)..(1117)
 <223> unknown

<400> 1
 gcgtgcctaa tacatgcaag tcgagcgcag gaagccgtct gaacccttcg gggggacgac 60
 ggtggaatga gcggcgagcg ggtgagtaac acgtaaagaa cctgcccata ggtctgggat 120
 aaccacgaga aatcggggct aataccggat gtgtcatcgg accgcatggg ccgctgatga 180
 aaggcgctcc ggcgtcgccc atggatggct ttgcggtgca ttagctagtt ggtggggtaa 240
 cgccccacca aggcgacgat gcatagccga cctgagaggg tgatcggcca cactgggact 300
 gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atggacgaaa 360
 gtctgatgga gcaacgccgc gtgaacgatg aaggctttcg ggtcgtaaag ttctgttgta 420
 aggaagaac aagtgccgca ggcaatggcg gcaccttgac ggtaccttgc gagaaagcca 480
 cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggtg gcaagcgttg tccggaatta 540
 ttgggcgtaa agcgcgcgca ggcgccctct taagtctgat gtgaaagccc ccggctcaac 600
 cggggagggc cattggaaac tgggaggctt gagtatagga gagaagagtg gaattccacg 660
 tgtagcggtg aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggccaaggcg actctttggc 720
 ctataactga cgctgaggct gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta 780
 gtccacgccg taaacgatga gtgctagggtg ttggagggtt tccgcccttc agtgctgaag 840
 ctaacgcatt aagcactccg cctggggagt acggtcgcaa ggctgaaact caaaggaatt 900
 gacggggacc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct 960
 taccaactct tgacatcccc ctgaccggtg cagagatgta ccttcccctt cgggggcagg 1020
 ggtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccc 1080
 caacgagcgc aacccttgct cttagttgcc agcattnagt tgggcactct agggagactg 1140
 ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaata atcatgcccc ttatgagttg 1200
 ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca aagggcagcg aagccgcgag gtggagccaa 1260
 tcccagaaag ccgttctcag ttcggattgc aggctgcaac tcgcctgcat gaagtgcgaa 1320

tcgctagtaa tcgcaggtca gcatactgcg gtgaatacgt tcccgggtct tgtacacacc 1380
gcccgtcaca ccacgagagt ttgcaacac cgaagtcggt gaggtaaccg taaggagcca 1440
gccgccgaag gtggggcaga tgattggggg gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag 1500
gtgcggctga 1510